

①9

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 181 534**

②1 Número de solicitud: 200001389

⑤1 Int. Cl.⁷: **C12N 15/67**

C12N 15/70

C12N 15/90

①2

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCION

B1

②2 Fecha de presentación: **31.05.2000**④3 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2003**Fecha de la concesión: **10.05.2004**④5 Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2004**④5 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.06.2004⑥1 Número de solicitud de la patente principal:
009901383⑦3 Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**⑦2 Inventor/es: **Cebolla Ramírez, Ángel;
Sousa Martín, Carolina y
Lorenzo Prieto, Víctor de**⑦4 Agente: **No consta**⑤4 Título: **Certificado de adición de la patente 9901383: Expresión regulada de genes usando un circuito genético en cascada.**

⑤7 Resumen:

Certificado de adición de la patente 9901383: Expresión regulada de genes usando un circuito genético en cascada.

La presente invención describe el diseño, preparación y uso de circuitos reguladores en cascada para amplificar la expresión génica. El circuito genético está basado en una pluralidad (dos o más) genes reguladores organizados en un orden jerárquico de expresión en una construcción o construcciones, que puede ser establecida en una célula, por ejemplo, bacterias gram negativas, por medio de vectores plasmídicos autorreplicativos o por inserción en cromosoma. En una demostración experimental del sistema, la construcción/es genéticas pueden ser mantenidas establemente en el cromosoma sin presión selectiva, y la expresión génica inducida tres órdenes de magnitud usando derivados benzóicos económicos y biodegradables.

ES 2 181 534 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Certificado de adición de la patente 9901383: Expresión regulada de genes usando un circuito genético en cascada.

Objeto de la invención

El objeto del presente certificado de adición es el diseño de circuitos de reguladores transcripcionales en cascada para amplificar la expresión génica. Otro objeto del presente certificado de adición es el uso de estos sistemas para la superproducción de polipéptidos tales como proteínas terapéuticas, enzimas, hormonas, factores de crecimiento, y apolipoproteínas in vitro, y en células como cultivos celulares. Esto tiene una gran utilidad industrial, por ejemplo, en la industria biotecnológica y farmacéutica.

Estado de la técnica

La superexpresión de genes clonados es muy conveniente cuando se desea purificar una proteína con alguna utilidad, tanto para la industria farmacéutica como para la investigación biomédica. La producción de grandes cantidades de proteínas a través de la clonación del gen que las codifica mediante el uso de técnicas del ADN recombinante, se ha realizado tradicionalmente usando vectores en multicopia con promotores fuertes regulados por proteínas represoras tales como los sistemas basados en el operón de la lactosa (Makrides, Microbiol. Rev. 60:512-538). Sin embargo, esta estrategia usual conlleva una serie de desventajas:

- 1) El mantenimiento de los vectores de expresión requiere el uso de antibióticos dando lugar a una merma metabólica, para producción industrial a gran escala, supone un costo adicional del medio de fermentación y la potencial contaminación de productos y deshechos (Nilsson y Skogman, Biotechnology. 4:901-903).
- 2) Controlar los niveles basales de expresión es muy conveniente para la producción de proteínas que posean cierta toxicidad celular, y para prevenir la selección de mutaciones en la bacteria que disminuyan la expresión del gen de interés y en la proteína recombinante de interés (Mertens y col. Biotechnology 13:175-179; Vilett y col. Mol. Microbiol. 17:493-504). Sin embargo, esto es difícil de lograr cuando los genes clonados están en plásmidos multicopia y, debido a que el ruido de los promotores más usados tipo *tac* o *trc*, incluso reprimidos, suelen ser bastante elevado. Los sistemas de regulación habituales, basados en un promotor fuerte y un represor codificado por el plásmido, implican una expresión transitoria del gen hasta que se sintetiza suficiente represor dando lugar a dificultades en la clonación cuando el gen heterólogo codifica una proteína con alguna toxicidad para la bacteria.
- 3) El inductor usado en los sistemas tradicionales derivados del promotor *lac* (IPTG) es caro para el uso en fermentadores y tiene cierta toxicidad (Figge y col., Cell 52:713-722).
- 4) Se ha demostrado que la alta expresión de proteínas recombinantes reduce la tasa de crecimiento celular y consecuentemente, toda la síntesis de proteínas (Bentley y col., Biotechnol. Bioeng. 35: 668-681; Dong y col. J. Bacteriol. 177:1497-1504). Esto se debe a que los vectores plasmídicos en multicopia usados compiten con la actividad metabólica de la bacteria hospedadora debido a la expresión de otros genes necesarios para el mantenimiento y replicación del plásmido, y que también están amplificados.
- 5) Gran parte de los vectores de expresión sólo replican en *E. coli.* que tiene limitaciones para la expresión o secreción de ciertas proteínas. Un sistema alternativo que elimina muchos de estos inconvenientes ha sido la utilización de vectores transposones miniTn5 (de Lorenzo y Timmis, Method Ezymol. 235:386 -405) que pueden insertar los genes heterólogos en el cromosoma bacteriano permitiendo una alta estabilidad de los mismos (Cebolla y col., Appl. Environ. Microbiol. 62:214-220; Suarez y col., Appl. Environ. Microbiol. 63:122-127). En este último trabajo se describe la producción estabilizada de la toxina pertúsica por la inserción en cromosoma por el mini Tn5 en *Bordetella bronchiseptica* bajo el control de un sistema regulado por salicilato, un inductor 1000 veces más barato que el IPTG (catálogo SIGMA 1998). El sistema regulador se basa en el gen que codifica para un regulador transcripcional positivo *nahR* que se activa por salicilato y su promotor *Psal* (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46). Sin embargo, los niveles obtenidos son relativamente pobres (0,1 % de las proteínas totales). Esto se debe sobre todo a que al estar los genes en monocopia en el cromosoma no hay amplificación de la expresión debida a dosis génica.

Para aumentar sustancialmente estos rendimientos manteniendo las cualidades de bajos niveles basales, estabilidad, espectro de hospedadores y bajo coste de la inducción, hemos diseñado un sistema en cascada que permite amplificar la expresión génica en respuesta a determinados inductores.

5 Explicación de la invención

El objeto del presente certificado de adición es un circuito genético en cascada que incluye al menos una o más construcciones de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de reguladores de transcripción. que están dispuestos en un orden jerárquico de tal manera que la expresión de un regulador situado corriente arriba de dicha pluralidad estimula la expresión de un regulador situado corriente abajo. El
10 circuito genético incluye además promotor diana final que responde de forma dependiente de dosis a un regulador localizado corriente abajo de dicha pluralidad de reguladores.

Dicho circuito incluye además corriente abajo de dicho promotor final un sitio de clonación múltiple.
15 Las construcciones de ácidos nucleicos pueden presentarse integradas en el cromosoma o en un plásmido autoreplicativo.

Los reguladores de transcripción, al menos algunos de ellos, responden a un inductor, por ejemplo a compuestos derivados del ácido benzoico, especialmente salicilato.

Otro objeto de la presente invención lo constituyen células que incluyen el referido circuito genético en cascada, por ejemplo células procarióticas o eucarióticas de mamífero, insecto, levadura o planta y especialmente células bacterianas gram-negativas.

Otro objeto del presente certificado de adición es un método de regulación de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que incluye los siguientes pasos:

- establecimiento de un circuito genético en cascada según las reivindicaciones 1-8.
- situar dicha secuencia de ácido nucleico bajo el control de dicho promotor diana final; y
- inducir dicho circuito genético en cascada para estimular la expresión de dicha secuencia de ácido
30 nucleico.

Dicha secuencia de ácido nucleico codifica enzimas, hormonas, factores de crecimiento, apolipoproteínas, proteínas terapéuticas y de diagnóstico, moléculas antisentido, ribozimas, rRNA, tRNA, snRNAs y también fragmentos o derivados de los mismos, así como moléculas indicadoras de diagnóstico.
35

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema del circuito regulador. El cassette regulador *nahR/Psal::xylS2* produce alta cantidad de XylS2 en presencia de salicilato. La proteína XylS2 es activada a su vez por la presencia del
40 inductor salicilato multiplicando el efecto estimulador del salicilato en la activación de *Pm*. Se produce entonces una producción amplificada de la proteína heteróloga.

Figura 2. Esquema de los vectores realizados para la construcción del circuito genético de expresión. A) vectores mini Tn5 construidos. El dibujo superior representa el esqueleto de los plásmidos suicidas pUT con origen de replicación R6K (*oriR6K*), el gen de la transposasa (*tnp**), el gen de la β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (*bla*), un origen de movilización del plásmido (*mob*), y las secuencias de inserción (extremo I y extremo O) que se representan como barras rellenas por líneas horizontales. Bajo esa misma base se encuentran el cassette regulador en pCNB4-S2 el cassette de expresión en pT-SPm. El sitio de restricción *NotI* es raro al reconocer 8 nucleótidos lo que hace infrecuente la presencia
50 del mismo en los genes heterólogos. B) Esquema del vector de expresión pCCD5 linealizado que contiene el promotor *Pm* antes de un MCS donde se puede clonar el gen de interés. Tiene un origen de replicación de M13 que permite realizar plásmido monocadena. Se muestra la estrategia de clonación de los distintos fragmentos que dieron lugar a una fusión *lpp'-ompA'-phoA* que fue probada como ejemplo de funcionamiento.
55

Figura 3. Esquema ejemplo de una estrategia para la construcción de vehículos mini Tn5 para inserción en monocopia de genes heterólogos por transposición. *tnp** es el gen de la transposasa. Extremo I y extremo O son las secuencias de inserción sustrato de la transposasa, cuyo contenido se transpone a la cepa receptora. El sitio *NotI* sirve para introducir entre las secuencias de inserción cualquier gen clonado
60 previamente en vectores auxiliares (pUC18Not en el dibujo) que contienen sitios de clonación múltiples flanqueados por sitios *NotI* (Tabla 1).

Figura 4. Comparación de la expresión de β -galactosidasa en unidades Miller (MU) con el sistema de reguladores en cascada y con los mismos reguladores en circuitos sencillos. A: cinética de la expresión de *lacZ* con los sistemas *nahR/Psal* (cuadrado), *xylS2/Pm* (triángulo), y *nahR/Psal::xylS21/Pm* (círculo) en cromosoma, en ausencia (símbolos vacíos) o en presencia de salicilato 2 mM (símbolos rellenos). B: producción de β -galactosidasa a distintas concentraciones de salicilato con el sistema *nahR/Psal* (círculo relleno), *xylS2/Pm* (triángulo) o *nahR/Psal::xylS2/Pm* (círculo vacío).

Figura 5: Capacidad de regulación de circuitos simples y con dos cascadas usando diferentes jerarquías de reguladores corriente arriba y corriente abajo. S: salicilato 2 mM; B: benzoato 2 mM. 3,5-dCLS: 3,5-diclorosalicilato 2 mM. Valores basales de actividad β -galactosidasa de cada circuito establecido en *E. coli*. Los niveles basales de actividad β -galactosidasa para cada circuito establecido en *E. coli* fueron los siguientes *nahR/Psal* (barras negras): 65 MU; *xylS2/Pm* (barras blancas) 192 MU; *nahR/Psal::xylS2/Pm* (barras grises) 169 MU; *xylS2/Pm::nahR/Psal* (barras rayadas) 69 MU. Los datos son los valores medios de tres experimentos independientes. Las correspondientes desviaciones standard se muestran con las barras de error.

Figura 6. Capacidad de regulación de circuitos simples y en cascada en *Pseudomonas putida*. Cepas que contienen en el cromosoma distintos minitransposones (primera columna) contienen el sistema regulador descrito en la leyenda se ensayaron para su acumulación de β -galactosidasa en respuesta a benzoato 2 mM. La cuarta columna muestra los reguladores y, orden secuencial en la cepa correspondiente. Los datos son el valor medio de tres experimentos independientes. Los niveles basales se indican en Unidades Miller.

Figura 7. Análisis de la expresión génica del sistema en cascada en *P. putida* con *nahR4-Psal* como primer sistema regulador y *xylS/Pm* como segundo. (a) Acumulación β -galactosidasa sin inductor (-), salicilato 2 mM (S), o benzoato 2 mM (B) con el sistema en cascada (izquierda) o el sistema simple *xylS/Pm::trp::lac-Z* (derecha). (b) Western bot para la detección de la producción en cultivos de *P. putida* (*nahR/Psal::xylS/Pm::trp::lacZ*) después de la incubación con distintos efectores.

30 Descripción detallada de la invención

Usando genes reguladores clave en los circuitos de control de la expresión de operones catabólicos, hemos demostrado las bases racionales para construir cascadas regulatorias para amplificar la capacidad de expresión génica en respuesta a compuestos aromáticos derivados del ácido benzoico. Sobre la base del mecanismo de activación del promotor *Pm* por los niveles y la actividad específica mediada por efecto de su regulador *XylS*, hemos acoplado la expresión del mutante *xylS2*, cuyo producto es activado por la presencia de salicilato, al sistema de control *nahR/Psal* que también es activo en presencia del mismo efector. Por tanto, la adición de salicilato o algunos compuestos derivados, es capaz de aumentar la concentración intracelular y la actividad de *XylS2*, dando lugar a una alta actividad del promotor *Pm*. Cualquier gen que se clone bajo el control de *Pm* será expresado hasta 20 veces más que cuando los sistemas no están acoplados.

Una concreción del sistema comprende un cassette que contiene los genes reguladores *nahR/Psal::xylS2* flanqueados por secuencias transponibles que facilitan la inserción estable en el cromosoma de una célula, por ejemplo bacterias gram negativas. Un módulo de expresión complementario que contiene el promotor diana *Pm* anterior a un sitio múltiple de clonación para facilitar la clonación del DNA recombinante usado como parte del sistema. El módulo de expresión puede ser introducido como plásmidos multicopias o transferido a cromosoma, por ejemplo, vía vectores de envío miniTn5 (si la estabilidad de la expresión y/o el menor nivel basal se desea). Para lograr esto, el módulo de expresión con el promotor *Pm* y los genes heterólogos están preferentemente flanqueados por sitios raros de restricción, por ejemplo, *NotI*, para posterior subclonación.

Un sistema de expresión de genes heterólogos ideal debe estar muy bien regulado, es decir, poseer unos niveles no inducidos muy, reducidos y una alta expresión en presencia del inductor. Para fermentación a escala industrial, es muy conveniente que el inductor sea barato y que la superexpresión del gen se haga de forma estable sin necesidad de presión selectiva. Esta expresión debería afectar mínimamente la capacidad del cultivo celular de obtener alta densidad de biomasa, y además sería conveniente que el vector de expresión se pudiera usar en una gran variedad de cepas bacterianas. La expresión inducida por salicilato usando el sistema de *nahR/Psal* en el cromosoma de bacterias Gram negativas ha demostrado ser muy estable y bien regulada cuando se introducen el cromosoma bacteriano mediante vectores miniTn5. Sin embargo, los niveles obtenidos son bastante bajos debido a tener una sola copia y de tener una capacidad de inducción limitada.

El promotor *Pm* en cambio ha demostrado tener un extraordinario rango de actividades que dependen tanto de la actividad específica de la proteína activadora *XylS* como de la concentración celular de la misma (Kessler y col., J. Bacteriol. 176:3171-3176). La actividad del promotor *Pm* aparece como difícilmente saturable in vivo Incluso aumentando extraordinariamente la cantidad intracelular de *XylS*, aun sigue generando mayor respuesta cuando se añade su inductor 3-metilbenzoato. Sin embargo, los sistemas de expresión realizados en base a estos elementos *xylS/Pm* mantienen unas cantidades constantes de expresión de *xylS* desperdiciando la capacidad amplificadora potencial que tendría controlar también su concentración intracelular. Esto se podría realizar acoplando la expresión de *xylS* a otro sistema de expresión (sistema primario). Hemos diseñado un circuito regulador dispuesto en cascada que permite unos niveles basales muy bajos en el promotor que exprese el gen heterólogo al producirse poco regulador en ausencia de inductor. En presencia de un inductor para el sistema primario y para el secundario, aumentarla la concentración del activador secundario y la actividad específica de éste. Puesto que en el caso de *xylS* estos dos eventos son sinérgicos, el efecto obtenido sobre *Pm* sería multiplicativo. Si un mismo efector pudiera inducir ambos procesos, el sistema de expresión se simplificaría. Esta invención describe como esto se puede realizar acoplando al sistema de expresión que responde a salicilato, *nahR/Psal*, el gen *xylS2* (Ramos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8467-8471), que es un mutante de *xylS* que, manteniendo sus propiedades, responde a salicilato además de benzoato. Un fragmento de 1.2 Kb con el gen *xylS2* se clonó por digestión total con *HindIII* y parcial con *NcoI* en los mismos sitios de pFH2 (Tabla 1). El plásmido pNS2 resultante fue digerido con *NotI* y el fragmento con *xylS2* se insertó en el plásmido pCNB4 para poner el gen regulador bajo el control del sistema *nahR/Psal* que se encuentra dentro de las secuencias de inserción mini Tn5 (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46). Se obtuvo así el plásmido pCNB4-S2 (Figura 1). Debido a que éste plásmido tiene un origen de replicación R6K (Kahn y col., Meth. Enzymol. 68:268-280), sólo replican en cepas que expresen la proteína π lo que en *E. coli* se consigue por medio de lisógenos del lago λ pir. Mediante la cepa donadora de vectores mini Tn5 S17-1(λ pir) podemos transferir el cassette regulador a otras cepas Gram negativas por conjugación biparental y posterior selección de la transposición por marcadores selectivos del minitransposon de la bacteria receptora (Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567; de Lorenzo y Timmis, Method. Enzymol. 235:386-405). Para verificar que es una inserción por transposición y que el plásmido R6K no se ha introducido, se chequean las colonias por la pérdida de resistencia a penicilinas por la presencia del gen de la β -lactamasa del plásmido suicida. De esta forma, cualquier cepa en la que se inserte el cassette regulador resultante, *nahR/Psal::xylS2*, producirá el regulador XylS2 en respuesta a salicilato (Figura 1). Estas cepas generadas podrán ser utilizadas para insertar mediante conjugación o transformación un segundo cassette o vector que contenga el promotor *Pm* fusionado al gen de interés. Para ello, la presente invención cuenta con dos vectores complementarios de expresión donde se clonarán los genes cuya superexpresión se desee. Uno de ellos, pTSPm, es un vector mini Tn5 que contiene dentro de las secuencias de inserción un gen de resistencia a estreptomicina, el promotor *Pm* y un sitio de restricción raro *NotI* tras él (Figura 2A). Para su construcción, un fragmento con el interposón omega (Fellay y col., Gene 52:147-1541) se insertó dentro sitio *BamHI* del vector pUC18Sfi-*Km^R*-*xylS*-*Pm*-Sfi (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46). El plásmido resultante se digirió con *SfiI* y el fragmento mayor fue clonado dentro del esqueleto pUT de un vector mini Tn5 (Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567) para obtener el plásmido pTSPm. En su, sitio *NotI* se clonarían genes que hayan sido previamente clonados en vectores auxiliares que contienen sitios múltiples de clonación flanqueados por sitios *NotI* (Tabla 1).

Un segundo vector de expresión complementario con origen de replicación ColE1 (pCCD5) contiene el promotor *Pm* previo a un sitio de clonación múltiple con un inicio de traducción bueno, donde se puede insertar el gen de interés (Figura 2B). Para la construcción de pCCD5, un fragmento *ApoI* que contenía el terminador transcripcional *rrnBT1* producido como un fragmento de PCR resultante de la reacción ADN de *E. coli* como molde y de los oligos 5'-GCAAATTT CCAGGCATCAATAA y 5'-GGGAATTCCTGGCAGTTTATGG, se clonó dentro del sitio *EcoRI* de pFH2. En el vector resultante, se originaba previo al MCS un sitio único *EcoRI*, donde se clonó un fragmento *ApoI* de 0,4 Kb con el promotor *Pm* obtenido por PCR usando los oligos

5'-GTGTCAAATTTGATAGGGATAAGTCC-3' y

5'-GCCTGAATTCAGGCATTGACGAAGGCA-3'

y el plásmido pUC18Sfi-*Km^R*-*xylS*-*Pm*-Sfi como molde. El plásmido resultante pCCD5, podría ser transformado en cepas que contengan el cassette regulador en cromosoma para sobreexpresar el gen heterólogo desde plásmido. Si se desea usarlo de forma estable en monocopia, la fusión *Pm* al gen heterólogo se puede escindir in vitro como fragmento *NotI* y clonarse dentro del sitio *NotI* de una gran gama de vectores mini Tn5 con posibilidad de elegir el marcador más indicado para la aplicación. Existen

hasta 8 marcadores genéticos distintos disponibles en vectores mini Tn5 con el sitio *NotI* adyacente donde se podría clonar las fusiones generadas (de Lorenzo, Trends Biotechnol. 12:365-371). Los vectores resultantes se pueden entonces insertar dentro del cromosoma de la bacteria seleccionada por conjugación.

TABLA 1

Plásmidos auxiliares para la clonación en pTSPm

Plásmido	Descripción	Referencia
pUC18Not	Equivalente a pUC18 (Yanish-Perron y col. 1985) pero su sitio múltiple de clonación (MCS) está flanqueado por sitios <i>NotI</i>	(Herrero y col., 1990)
p18Not	Equivalente a pUC18 pero con un MCS <i>EcoRI</i> <i>Sall-HindIII</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i>	(Herrero y col., 1990)
pVDL8	Vector de bajo número de copias que contiene el mismo MCS que p18Not. Recomendado para clonación de proteínas tóxicas difíciles de mantener en plásmidos de alto número de copias.	(Fernández y col. 1996)
pFH2	Origen de replicación de pBR322 y del fago M13. Permite la generación in vivo de proteínas truncadas en los extremos amino y carboxilo, y provee de una buena secuencia de iniciación de la traducción.	(Fernández y col. 1996)

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1

Comparación de la superexpresión del gen de la β -galactosidasa mediante el circuito en cascada frente a circuitos simples

Ejemplo 1.1.

Construcción de un circuito en cascada

Este ejemplo ilustra las bases racionales, construcción y validación de un circuito en cascada para expresión génica en relación con un circuito simple.

Para probar la eficacia del circuito amplificador, hemos construido un plásmido que contiene una fusión de *Pm* a *trpA'::lacZ*, clonando éste fragmento en el sitio *NotI* de pTSPm, dando lugar al plásmido pTSPm-lacZ. La fusión construida fue insertada en el cromosoma de CC118 a través de la cepa donadora S17-1(λ pir) que contenía el plásmido pTSPm-lacZ en medio LB-citrato 0.8% para reducir la transfección de λ pir. La comunidad de bacterias resistentes a estreptomycin 25 mg/l y rifampicina 50 mg/l, fue usada como receptor en otra conjugación usando *E. coli* S17-1(λ pir) (pCNCB4-S2) como donadora. Para seleccionar los transconjugantes, se seleccionaron colonias resistentes a rifampicina, estreptomycin y kanamicina (25mg/l). Diez colonias sensibles a ampicilina (100 mg/ml) se seleccionaron para posterior estudio en ensayos de actividad β -galactosidasa. Se realizaron cultivos bacterianos durante la noche de colonias de cada transconjugante en medio LB (extracto de levadura 5 g/l, tripton 10 g/l, NaCl 5 g/l) a 37°C en agitación. Se diluyeron 1:100 veces en medio fresco sin selección antibiótica e incubadas durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular se le añadió salicilato a 2 mM y se incubó a 30°C en agitación durante 5 horas. Los niveles de producción sin inductor variaron entre 100 a 400 unidades de Miller dependiendo del transconjugante. La expresión de β -galactosidasa se indujo dramáticamente cuando los cultivos se inducían con salicilato, hasta unos valores de 25000 a 50000 unidades Miller, que correspondían a una tasa de inducción de 150 a 400 veces dependiendo del transconjugante. Esto debe ser debido a la cercanía de la inserción al origen de replicación *OriC* al tener mayor número de copias promedio por célula. Para

comparar la expresión de *lacZ* desde el nuevo sistema con los otros sistemas tradicionales que responden a salicilato, se usaron inserciones de fusiones *nahR/Psal::lacZ* (pCNB4-*lacZ*) o *xylS2/Pm::lacZ* (pCNB2-*lacZ*) insertados en el cromosoma de *E. coli* CC118 presente en las cepas RSL7 y FH26, respectivamente. La tasa de inducción en respuesta a salicilato y los valores absolutos obtenidos por los sistemas simples fueron 20 veces inferiores que los del sistema en cascada de CC1184S2PT38. Se obtenía una rápida inducción desde los primeros instantes que alcanza un máximo a las 5 horas de la adición de salicilato (Figura 4A). Una concentración de 0,5 mM de salicilato inducía más del 90 % de la actividad máxima a las 5 horas de inducción (Figura 4B). Otros compuestos derivados del benzoato, tales como el o-acetil-salicilato, 3-metil-benzoato, o antranilato, demostraron tener una capacidad inductora equivalente o ligeramente superior a la del salicilato. De las diez cepas transconjugantes con el sistema regulador y la fusión promotor-*lacZ* seleccionamos para posterior análisis aquellas con mayor tasa de inducción (CC1184S2PT38) y la que posea los niveles absolutos de producción más altos (CC1184S2PT97). Un gel de SDS-poliacrilamida mostró que la acumulación de β -galactosidasa era más del 11 % de las proteínas totales para CC1184S2PT97 y del 9 % para CC1184S2PT38, frente a menos del 0.6 % para los sistemas simples (Figura 4).

TABLA 2

Comparación de actividad β -galactosidasa y la estabilidad del gen heterólogo con los sistemas simples y en cascada en distintas configuraciones

Cepa	Plásmido	^a Actividad β -galactosidasa		^b β -galactosidasa/proteínas s (%)		^c colonias lac+ totale (%)	
		-2OHB	+2OHB	-2OHB	+2OHB	-2OHB	+2OHB
CC118 λ <i>pir</i>	pTSPm- <i>lacZ</i>	1211	1358	ND ^d	ND	100	100
CC118 λ <i>pir</i>	pCNB2- <i>lacZ</i>	10917	67002	3.6	13	98-81	20-1.5
CC118 λ <i>pir</i>	pCNB4- <i>lacZ</i>	510	17952	ND	3.9	100-97	96-85
CC1184S2PMT32	-	171	30383	ND	8.8	100	100
CC1184S2PMT97	-	408	39143	ND	11	100	100
CC1184S2 λ <i>pir</i>	pTSPm- <i>lacZ</i>	1487	78257	ND	20	100-99	5-0

Los cultivos se crecieron durante una noche a 37°C en LB con (cepas con plásmidos) o sin ampicilina (150 μ g/ml). Los cultivos se diluyeron 1:100 en el mismo medio sin selección antibiótica e incubados durante 2 horas a 37°C. ^aSe incubaron series de suspensiones celulares con o sin salicilato 2 mM de concentración final a 30°C. Los niveles de actividad β -galactosidasa se midieron enzimáticamente y se tomaron a las 5 horas muestras para estimar la superproducción de proteínas en geles de electroforesis en poliácridamida-SDS. Las medidas de la cantidad relativa de β -galactosidasa se hizo por densitometría de los geles teñidos con coomasie.

El ensayo de estabilidad se realizó realizando cultivos en cultivos discontinuos seriados sin adición de antibióticos selectivos y en presencia o ausencia de salicilato a 30°C. Tras aproximadamente 40 a 50 generaciones, los cultivos se diluyeron para obtener colonias aisladas en medio LB con Xgal. Este compuesto revela la actividad β -galactosidasa en placa mediante la acumulación de un producto azul en las colonias. El tanto por ciento de colonias azules frente al total de colonias fue asumido como el porcentaje de bacterias formadoras de colonias que mantienen su capacidad de superexpresar *lacZ*. Se realizaron tres experimentos independientes para cada cepa en cada condición. Se muestran los valores máximos y mínimos de los tres experimentos. Las variaciones son altas debido a que el evento de pérdida de la capacidad de expresar *lacZ* es muy favorecedor para una población bacteriana y dependiendo de lo temprano del evento estocástico, se genera una gran variación de las poblaciones bacterianas debido también a la naturaleza exponencial del crecimiento bacteriano. Aquellos casos con resultados repetitivos se muestran con valor único. N determinado = 0,5%.

Ejemplo 1.2

Comparación de un sistema en cascada con un circuito simple en varias configuraciones

Puesto que la amplificación de la expresión podría incrementarse si el regulador/promotor simple estuviera en el plásmido debido al incremento de la dosis génica, exploramos la conveniencia de usar distintas configuraciones de activador/promotor para superproducción de proteínas. Para realizar esto,

usamos los mismos plásmidos mini Tn5 pero usando la cepa CC118 λ pir donde pueden replicar. Las cepas con plásmidos pCNB4-lacZ o pCNB2-lacZ mostraban incrementos de 10 a 30 veces respecto a la expresión en monocopia indicando el aumento de la dosis génica. La comparación de los sistemas simples en plásmidos frente al sistema en cascada en cromosoma indica que el nivel basal es 3 y 64 veces inferior a las cepas con pCNB4-lacZ y pCNB2-lacZ, respectivamente. En condiciones inducidas, se puede tener unos niveles de producción β -galactosidasa con el sistema en cascada cromosómico más de dos veces superior a los de *nahR/Psal* en plásmidos y entre un 50-80 % de la cepa con pCNB2-lacZ. Para combinar el nivel de regulación con mayores niveles de rendimiento de producción, construimos una cepa con el cassette regulador que llevaba también el fago λ pir lisogenizado para permitir la replicación de pTSPm-lacZ. La configuración plasmídica de la fusión de *Pm* al gen heterólogo obtenía los máximos niveles de producción β -galactosidasa y un más bajo nivel basal de expresión respecto de la cepa con pCNB2-lacZ. Sin embargo, hemos demostrado que la estabilidad del sistema en cascada en cromosoma en condiciones de superexpresión es del 100 % en las condiciones que empleamos. En cambio, los sistemas plasmídicos mostraban poblaciones bacterianas que perdían la capacidad de producir β -galactosidasa en una extensión que se correlacionaba con la actividad mostrada en los ensayos enzimáticos a las 5 horas de inducción. Además, en condiciones de inducción, los cultivos finales con el sistema en cascada cromosómico alcanzaban unas densidades de células viables hasta 10 veces mayores que la superexpresión desde plásmidos. Esta observación explica también por la existencia de otros genes heterólogos de los plásmidos (necesarios para la replicación y su mantenimiento) que también se encuentran en multicopia y cuya superexpresión podría afectar significativamente el crecimiento bacteriano.

Ejemplo 2

Uso del sistema en cascada para la superexpresión de una fusión génica *lpp-ompA-phoA*

Este ejemplo ilustra el uso de un sistema de expresión en cascada con un vector de expresión autorreplicativo con el promotor *Pm* para superexpresar un DNA recombinante que codifica una proteína de membrana.

Para evitar los requerimientos de la proteína p en los vectores de expresión construimos el plásmido de expresión basado en *Pm* con un origen de replicación ColE1. El plásmido pCCD5 se hizo basado en el vector pFH2 (Fernández y col., Mol. Microbiol. 16:205-213), y que incluye un MCS que permite una fácil construcción de genes truncados. pCCD5 contiene un terminador transcripcional (*rrnBT1*) para reducir la lectura a través de promotores aguas arriba a *Pm*. Puesto que todo el cassette de expresión está flanqueado por sitios de restricción del *NotI*, también puede usarse para clonar en vectores mini Tn5 e introducirlo luego en cepas CNB4-S2. Usamos pCCD5 para clonar una fusión híbrida *lpp-ompA-phoA* que al codificar una proteína de membrana externa son difíciles de clonar usando los sistemas de expresión habituales, ya que suelen producir un daño celular notable con el mero escape del promotor usado. Para ello, obtuvimos el fragmento *lpp*'-'*ompA* de pTX101 (Francisco y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10444-10448) usando los oligos

5'-GAGGAATTCAATCTAGAGGGTATTAATA y

5'-CGGGATCCCCGTTGTCCGGACGAGTGCC.

El fragmento se digirió con *EcoRI* y *BamHI* e insertado en los mismos sitios pCCD5, resultando el plásmido p5LOA2. El gen de la fosfatasa alcalina *phoA*, fue clonado desde pPHO7 como un fragmento *BamHI* y clonado como fragmento *BamHI* en p5LOA2 (Figura 2B). El plásmido resultante, pLOA2-AP, se introdujo en CC1184S2 mediante transformación. Los cultivos bacterianos con CC1184S2 (p5LOA2-*phoA*) pudieron producir en condiciones de inducción más de un 20 % de proteínas totales tras la adición de salicilato, sin poder distinguirse ninguna producción en condiciones no inducidas. La proteína fue superproducida a su máximo nivel entre las dos y tres horas después de la inducción.

Ejemplo 3

Inducción del sistema en cascada por otros inductores derivados del salicilato

Este ejemplo ilustra como las moléculas efectoras *NahR* y *XylS2* pueden amplificar sinérgicamente la expresión génica cuando se integra apropiadamente en un sistema en cascada. Para determinar otros inductores de *nahR* y *xylS2* que pudieran provocar también la amplificación de la expresión génica, pusimos cultivos con el sistema en cascada (CC1184S2PMT32) y simples (CC118RSL9 y CC118FH26) en contacto con distintos derivados del salicilato a 2 mM durante 5 horas a 30°C, y medimos la inducción

de la actividad β -galactosidasa acumulada. Los resultados resumidos en la tabla 3 muestran que otras moléculas como el antranilato o el 5-cloro-salicilato pueden aumentar la actividad β -galactosidasa más de un 10 % con respecto al salicilato. Todas las moléculas probadas tenían una capacidad de inducción mayor en el sistema en cascada que en los sistemas simples.

TABLA 3

Razón actividad β -galactosidasa en ausencia de inductor y en presencia del mismo

Inductor	<i>nahR/Psal</i>	<i>xylS2/Pm</i>	<i>nahR/Psal</i> > <i>xylS2/Pm</i>
Salicilato	24	13	235
Antranilato	22	11	285
2-Acetil salicilato	40	10	249
4-Cloro-salicilato	33	1	191
5-Cloro-salicilato	32	3	268
3,5-Dicloro-salicilato	18	1	147
5-Metoxi-salicilato	3	46	183
Benzoato	1	44	82
3-Metil-benzoato	11	63	240
2-Metoxi-benzoato	33	10	160
3-Metil-salicilato	17	46	218
4-Metil-salicilato	21	7	203
5-Metil-salicilato	30	19	257

Ejemplo 4

La eficiencia de amplificación del circuito en cascada depende principalmente de las características del segundo regulador

Este ejemplo ilustra que hay requerimientos específicos del segundo sistema regulador para lograr la amplificación de la capacidad de expresión génica por un circuito en cascada. Se demuestra como la actividad del promotor diana que expresa el ADN recombinante debe ser dependiente de dosis en un amplio rango de concentraciones del regulador segundo (o terminal).

Para determinar la importancia de la jerarquía regulatoria para el efecto amplificador, se estudio el efecto de intercambiar el orden de los reguladores primarios y secundarios en el sistema en cascada basado en *XylS2/NahR* construyendo la cepa *E. coli* CC1182NRSL7. El cromosoma de esta cepa contiene los elementos de ADN *xylS2/Pm::nahR* y *Psal::trp':lacZ* mediante inserción previa por vectores miniTn5. Por tanto, es equivalente a la cepa *E. coli* strain CC1184S2PT32 exceptuando el orden concertado de expresión de los reguladores. Como se muestra en la figura 5, la capacidad del sistema en cascada reverso con respecto al salicilato como inductor (24 veces el nivel basal) no incrementa la capacidad sobre el elemento simple *nahR/Psal::lacZ*. En esta misma línea, el sistema reverso de CC1182NRSL7 fue insensible al efector benzoato que sólo activa a *XylS2*. Estas observaciones indican que la superexpresión de *nahR* no resulta en un incremento paralelo de la actividad de *Psal*, sino en un exceso improductivo del segundo regulador ya que la misma capacidad de expresión génica podría obtenerse mediante niveles de *NahR* relativamente bajos. Estudios en el mecanismo de la activación de *Psal* indica que el sitio de unión del activador está ocupado independientemente de la presencia del efector/inductor (Huang and Schell, J. Bio. Chem. 266:10830-10838). Por tanto, el promotor *Psal* parece depender exclusivamente de la presencia o ausencia de salicilato y la superexpresión de *nahR* no produce mayor actividad promotora. Estos resultados indican que la eficiencia de acoplamiento de una cascada regulatoria requiere propiedades específicas del sistema regulador/promotor secundario que incluye, al menos, la activación del promotor diana de una forma dependiente de dosis por un ancho rango de concentración del regulador. Esto ocurre para *xylS2/Pm* pero no para *nahR/Psal*. Por tanto, la mera activación de los dos reguladores por los mismos efectores no garantiza un efecto amplificador en cascada al menos que se presenten en una adecuada jerarquía, basada en el mecanismo apropiado del regulador secundario.

Ejemplo 5

Modificación del sistema en cascada para amplificar la expresión en respuesta a benzoato en Pseudomonas putida

Ejemplo 5.1.

El presente ejemplo muestra que el sistema en cascada podría ser rediseñado para responder a otras señales en microorganismos distintos a *E. coli*. Se desarrolló el diseño de cepas de *P. putida* especializadas para responder a otras señales moleculares distintas. Se diseñaron para ello cepas de *Pseudomonas* con circuitos en cascada para que amplificaran la capacidad de expresión génica en respuesta a benzoato. Puesto que el regulador XylS2 ya responde a ese inductor (Figura 6), el diseño de la nueva cascada implica mayormente la modificación del regulador primario. Para conseguir esto, se emplearon dos mutantes de *nahR*, *nahR3* y *nahR4*, que codifican variantes inducibles por benzoato usando los plásmidos miniTn5 pCNB43 y pCNB44 (Cebolla y col., J. Biol. Chem. 272:3986-3992). Se ensamblaron en dos construcciones *nahR3/Psal::xylS2* y *nahR4/Psal::xylS2* y se combinaron con la construcción *Pm::trp':lacZ* de los ejemplos anteriores, e insertado entonces en el cromosoma de *P. putida* KT2442 para rendir *P. putida* 43S2PmL y *P. putida* 44S2PmL. La inducción de estas cepas por benzoato se comparó con aquellas de las cepas de *P. putida* KT2442 que contenían tanto los elementos simples NSL7 (*nahR/Psal::lacZ*), 43L (*nahR3/Psal::lacZ*), 44L (*nahR4/Psal::lacZ*) y S2PmL (*xylS2/Pm::lacZ*) (Figura 6). Las cascadas con la los mutantes de *nahR* que responden a benzoato, 43S2L (*nahR3/Psal::xylS2*, *Pm::lacZ*) y 44S2PmL (*nahR4/Psal::xylS2*, *Pm::lacZ*), incrementan de 6 a 35 veces la capacidad de expresión génica con respecto a los sistemas de expresión simples. En cambio, el circuito en cascada con el *nahR* silvestre (4S2PmL) muestra una inducción más reducida por benzoato (7 veces), debido a la ausencia de un regulador primario para benzoato. Estos experimentos muestran que el estímulo simultáneo de ambos reguladores por la adquisición de un regulador primario que responda a benzoato es necesario para dar lugar a la amplificación de la capacidad de expresión génica.

Ejemplo 5.2

Este ejemplo ilustra experimentos diseñados para eliminar la posibilidad de que las propiedades amplificatorias sean sólo un rasgo particular de la forma mutante de XylS (XylS2) y no del tipo silvestre. Para demostrar que el sistema de amplificación en cascada puede rediseñarse para dirigir su respuesta hacia otras señales inductoras y en otros organismos distintos a *E. coli*, se realizó una cepa especializada de *Pseudomonas putida* con el módulo regulador modificado para amplificar la respuesta a benzoato. El diseño racional de esta cepa especializada contempla un regulador primario y uno secundario que respondan a benzoato. Se usó como regulador primario el mutante del regulador *nahR*, *nahR4* que es capaz de reconocer benzoato además de salicilato (Cebolla y col., J. Biol. Chem. 272:3986-3992), y como secundario se usó el regulador silvestre *xylS* capaz de reconocer benzoato pero no salicilato (Ramos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8467-8471). Para ello se generó el plásmido pNS intercambiando fragmentos *NcoI* de pNS2 y pCNB1 (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46). Un fragmento *NotI* de pNS con el *xylS* se clonó en el sitio *NotI* del plásmido pCNB44 (Cebolla y col., J. Biol. Chem. 272:3986-3992) dando lugar al plásmido pCNB44-S, con una construcción *nahR4/Psal::xylS*, y el gen de resistencia a la kanamicina dentro de las secuencias transponibles miniTn5. La construcción con la fusión *Pm::trp':lacZ* en pTPm-lacZ y la contenida en pCNB44-S se establecieron en el cromosoma de *Pseudomonas putida* KT2442 por conjugación a través de la cepa donadora S17-1 λ pir y selección con los marcadores correspondientes. Un par de transconjugantes obtenidos se probaron para ver la inducibilidad de la actividad β -galactosidasa en respuesta a salicilato (inductor de NahR4 pero no de XylS) o a benzoato (inductor del NahR4 y de XylS). La cepa mostró inducirse cuatro veces más cuando se añadía benzoato al medio de cultivo que cuando se añadió salicilato, a pesar de que la capacidad para inducirse por salicilato de *nahR4* era mayor que por benzoato. Esto se demostró mediante un análisis de Western blot (Figura 7) donde se puede observar mayor acumulación de XylS cuando se ponía en el medio salicilato que cuando se añadía benzoato. Sin embargo, el XylS producido no es activado por el salicilato y si lo es en cambio por el benzoato. Esto indicaba que es fundamental que haya respuesta simultánea de ambos reguladores para conseguir el efecto amplificador.

REIVINDICACIONES

1. Circuito genético en cascada que incluye

5 una o más construcciones de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de reguladores de transcripción, estando dichos reguladores codificados dispuestos en un orden jerárquico de tal manera que la expresión de un regulador situado corriente arriba de dicha pluralidad estimula la expresión de un regulador situado corriente abajo y

10 un promotor diana final que responde de forma dependiente de dosis a un regulador terminal localizado corriente abajo de dicha pluralidad de reguladores.

2. Circuito genético en cascada según la reivindicación 1 que incluye adicionalmente corriente abajo de dicho promotor diana final, un sitio de clonación múltiple.

15 3. Circuito genético en cascada según la reivindicación 1 **caracterizado** porque al menos una de las construcciones de ácidos nucleicos se presenta integrada en el cromosoma.

4. Circuito genético en cascada según la reivindicación 1 **caracterizado** porque al menos una de las construcciones de ácidos nucleicos se presenta en un plásmido autoreplicativo.

5. Circuito genético en cascada según la reivindicación 1 **caracterizado** porque al menos uno de los reguladores de transcripción responde a un inductor.

25 6. Circuito genético en cascada según la reivindicación 5 **caracterizado** porque dicho inductor es capaz de inducir la expresión de más de un regulador de dicha pluralidad de reguladores.

7. Circuito genético en cascada según la reivindicación 6 **caracterizado** porque dicho inductor es un derivado del ácido benzoico.

30 8. Circuito genético en cascada según la reivindicación 6 **caracterizado** porque dicho derivado del ácido benzoico es salicilato.

9. Célula que incluye un circuito genético en cascada según las reivindicaciones 1-8.

35 10. Célula según la reivindicación 9 **caracterizada** porque dicha célula ha sido seleccionada del grupo de células procarióticas y eucarióticas.

11. Célula según la reivindicación 10, **caracterizada** porque dicha célula es una célula eucariótica seleccionada del grupo de células eucarióticas de mamífero, insecto, levadura o planta.

12. Célula según la reivindicación 9, **caracterizada** porque dicha célula es una célula bacteriana.

45 13. Célula según la reivindicación 12, **caracterizada** porque dicha célula bacteriana, es una célula bacteriana gram-negativa.

14. Método de regulación de la expresión de una secuencia de ácido nucleico que incluye:

- establecimiento de un circuito genético en cascada según las reivindicaciones 1-8.
- 50 - situar dicha secuencia de ácido nucleico bajo el control de dicho promotor diana final; y
- inducir dicho circuito genético en cascada para estimular la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico.

15. Método según la reivindicación 14 **caracterizado** porque dicha secuencia de ácido nucleico codifica enzimas, hormonas, factores de crecimiento, apolipoproteínas, proteínas terapéuticas, proteínas o moléculas de diagnóstico, moléculas antisentido, ribozimas, rRNA, tRNA, snRNAs y también fragmentos o derivados de los mismos.

60 16. Método según la reivindicación 15 **caracterizado** porque dicho compuesto codificado es una molécula indicadora de diagnóstico.

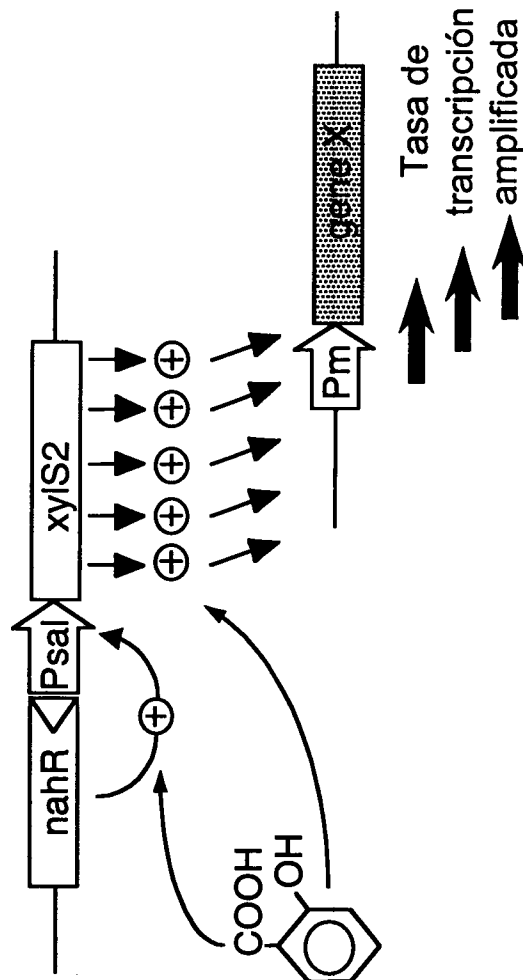
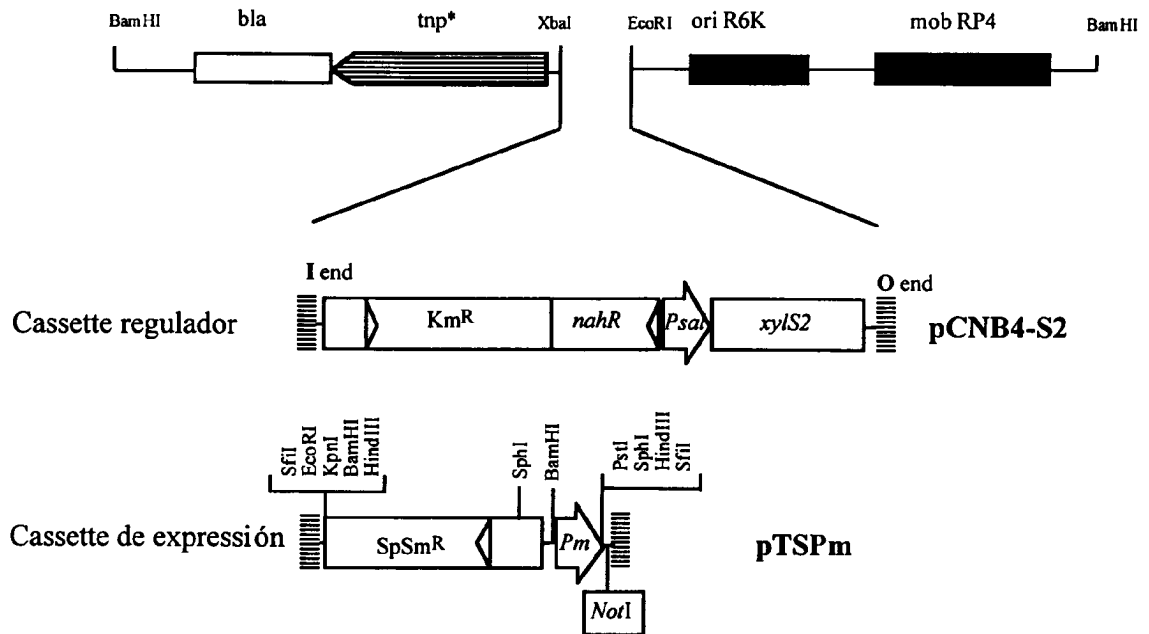


Figura 1

a



b

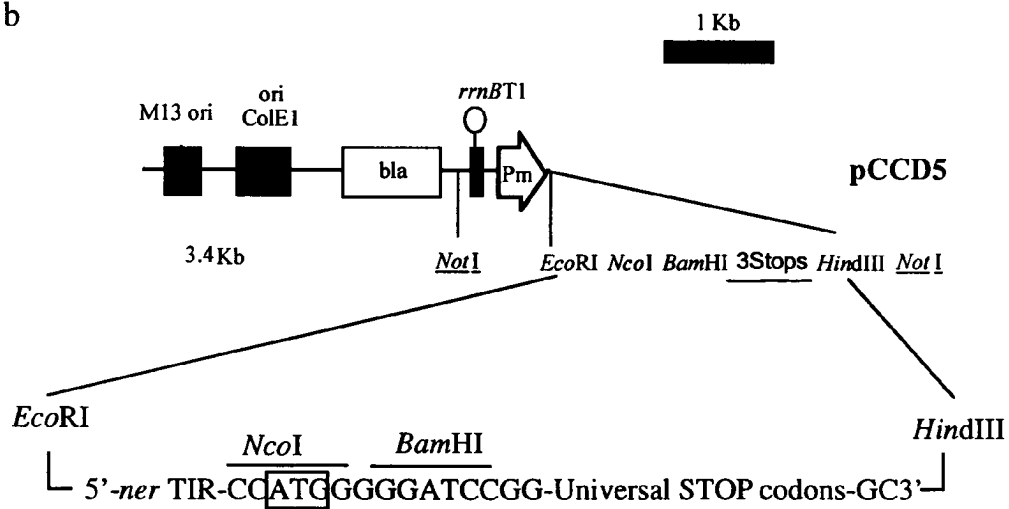


Figura 2

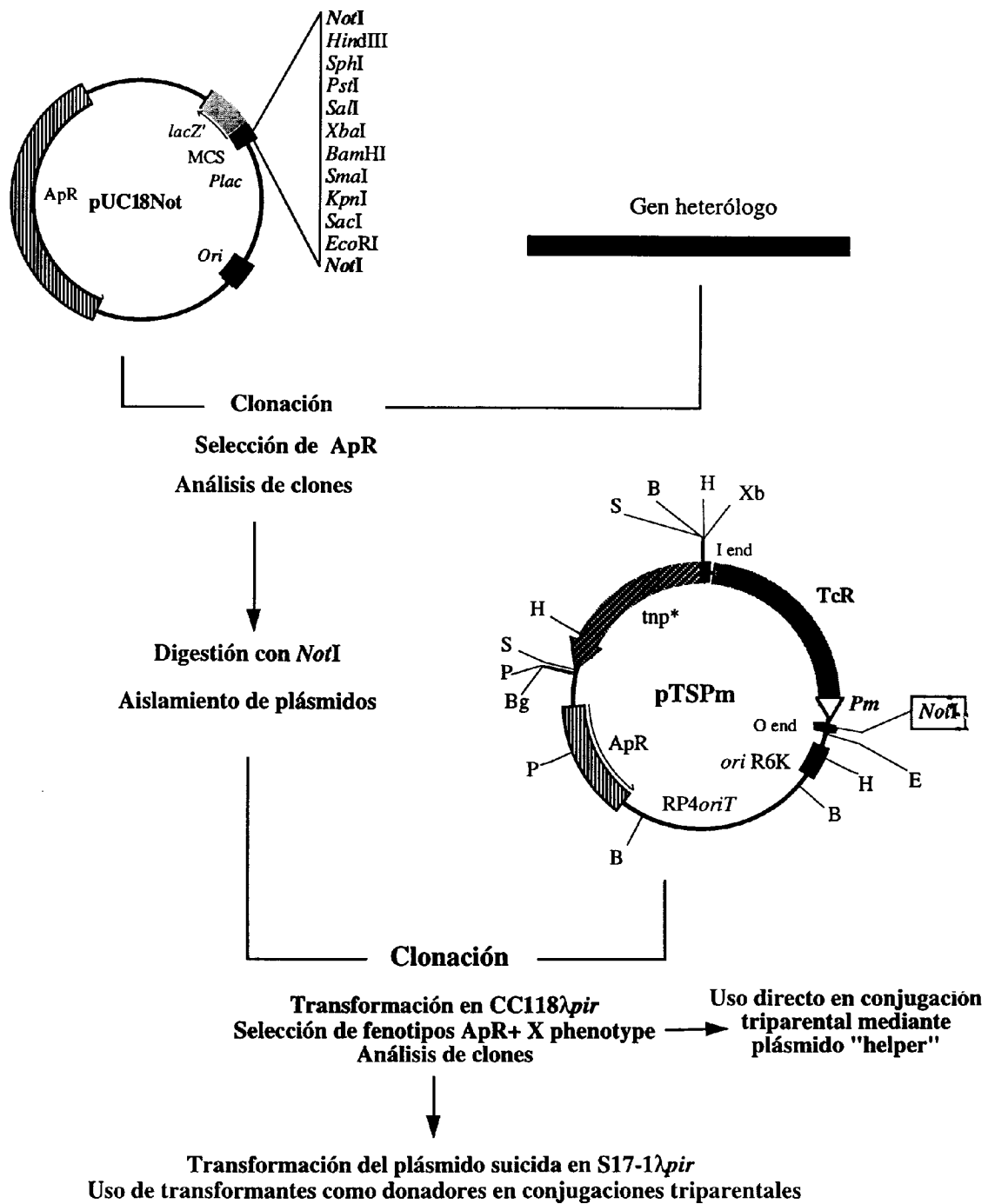
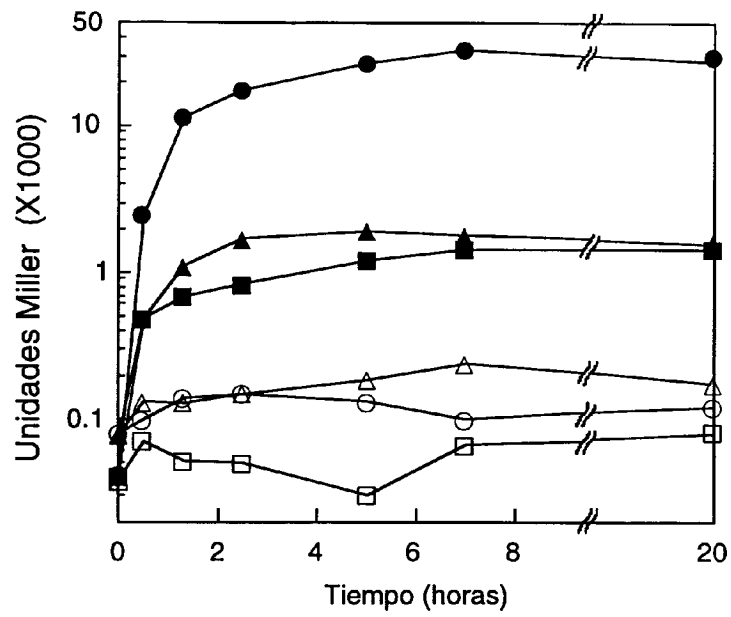


Figura 3

a



b

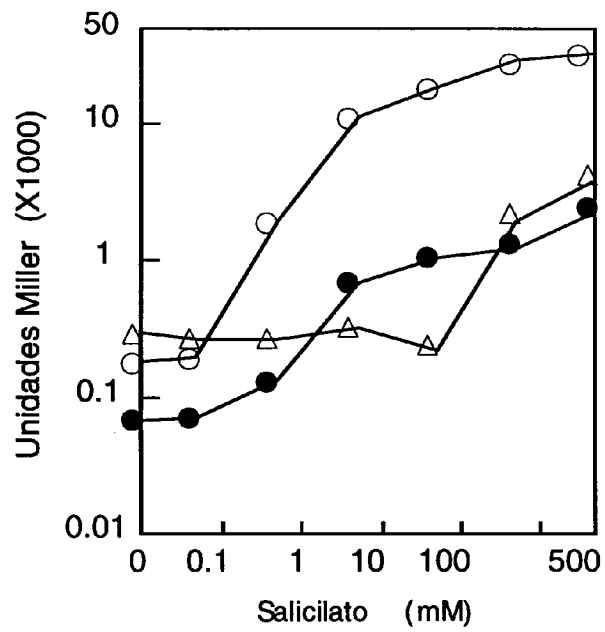


Figura 4

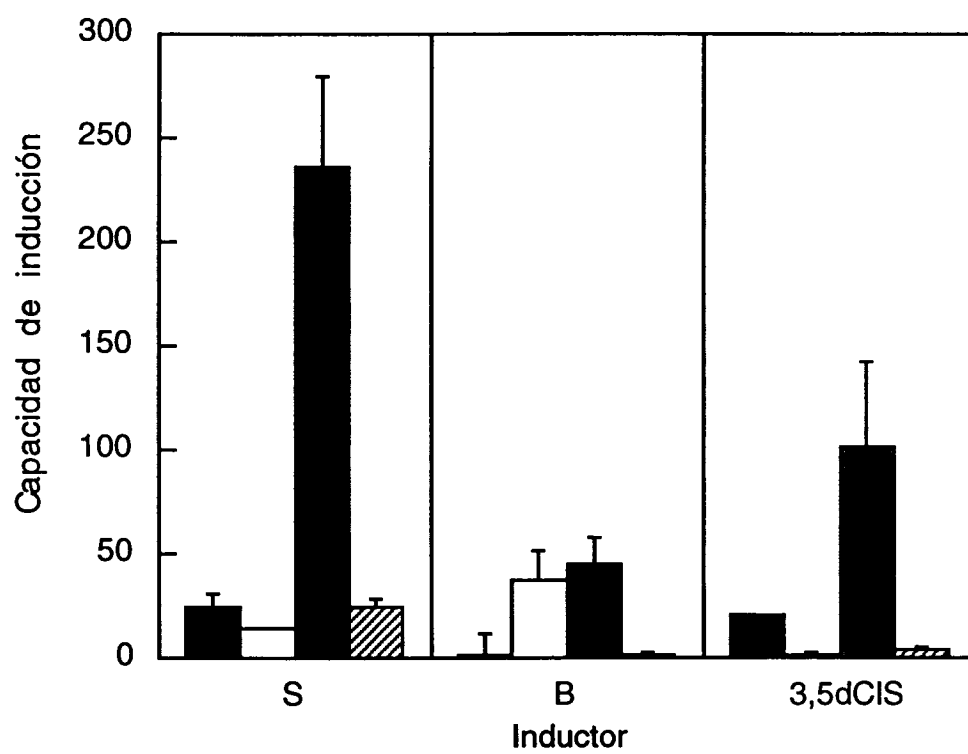


Figura 5

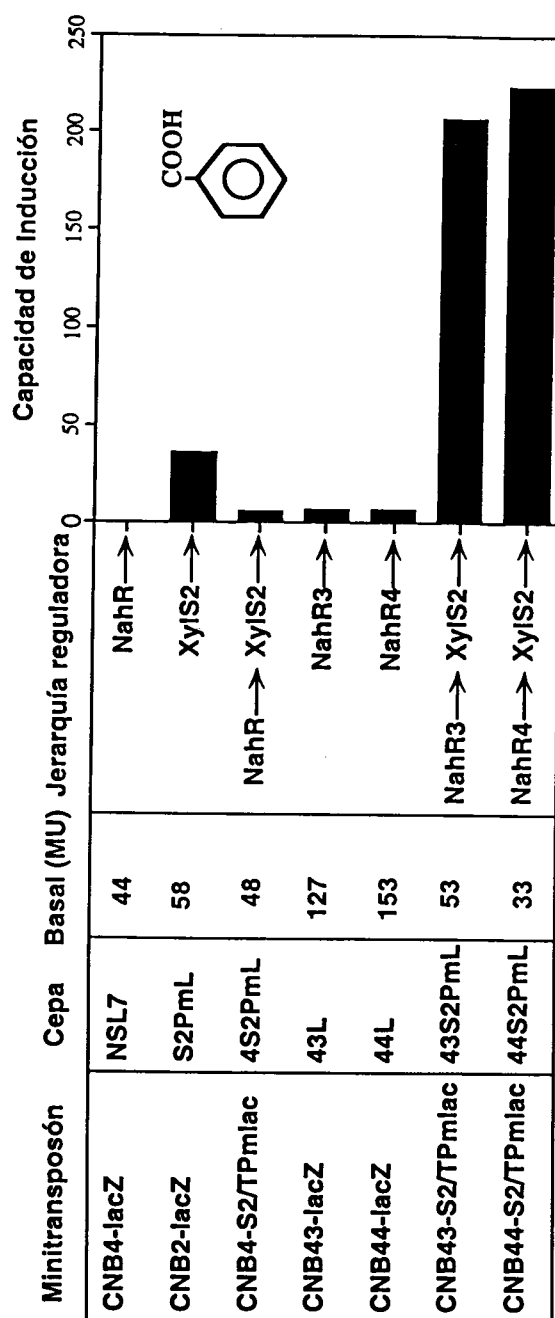


Figura 6

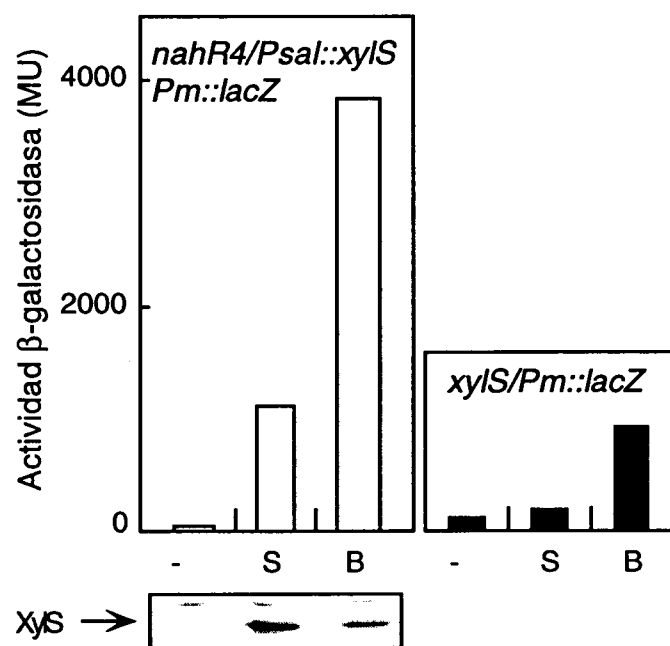


Figura 7



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 181 534

⑫ Nº de solicitud: 200001389

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2000

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12N 15/67, 15/70, 15/90

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	INOUE, S. et al. "Overproduction of the Xyl S gene product and activation of the xyl DLEGF operon on the TOL plasmid", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1987, Vol. 169, Nº 8, páginas 3587-3592. Todo el documento.	1-15
X	EP 0455424 A (MERCK & CO. INC.) 06.11.1991, página 3, línea 54 - página 4, línea 10; página 4, línea 20 - página 8, línea 21.	1-6,9-11, 14-16
X	WO 9008830 A (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 09.08.1990, página 3, línea 7 - página 5, línea 16; página 7, línea 4 - página 10, línea 22; página 25, línea 16 - página 26, línea 30.	1-6,9-11, 14-16
X	RAMOS, J.L. et al. "Transcriptional control of the Pseudomonas TOL plasmid catabolic operons in achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators", ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY, 1997, Vol. 51, páginas 341-373. Todo el documento.	1,4-14
X	CEBOLLA, A. et al. "Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobium meliloti", MICROBIOLOGÍA, 1994, Vol. 10, páginas 371-384. Todo el documento.	1,5,6, 9-11,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

20.01.2003

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1